

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

**STRUKTURA I ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE U**  
**BILJAKA**

**STRUCTURE AND ROLE OF ALTERNATIVE OXIDASE IN**  
**PLANTS**

**ZAVRŠNI SEMINAR**

Student: Katarina Plavec

Preddiplomski studij Molekularna biologija

Undergraduate study of Molecular Biology

Mentor: doc. dr. sc. Željka Vidaković - Cifrek

Zagreb, 2010.

## **POPIS KRATICA**

AOX - alternativna oksidaza

EXXH motiv - slijed od 4 aminokiseline, E - glutamat, H - histidin, X - bilo koja aminokiselina

## **SADRŽAJ**

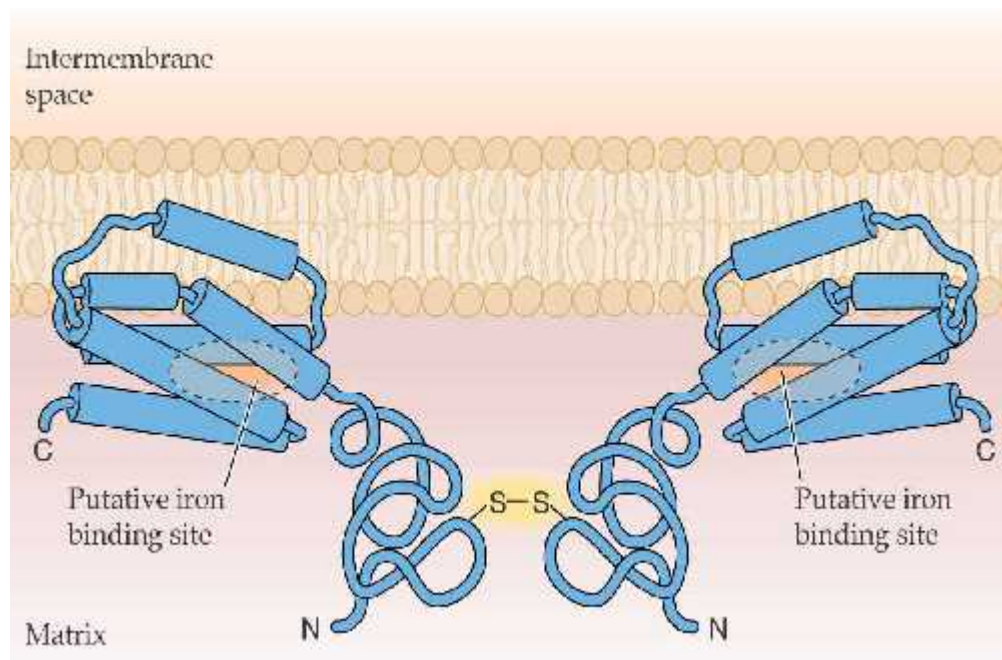
<b>1. UVOD .....</b>	<b>3</b>
<b>2. STRUKTURA ALTERNATIVNE OKSIDAZE .....</b>	<b>5</b>
<b>3. ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE .....</b>	<b>7</b>
<b>4. LITERATURA .....</b>	<b>10</b>
<b>5. SAŽETAK.....</b>	<b>12</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## 1. UVOD

Alternativna oksidaza je sastavnica lanca prijenosa elektrona u mitohondrijima, a osim u mitohondrijima pronađena je i u kloroplastima. Funkcija i struktura najviše su istraživane u biljkama, iako je poznato da je prisutna i u nekim skupinama životinjskih organizama - u bodljikašima, koluti avcima, mekušcima, spužvama i žarnjacima. Nije pronađena u arheobakterijama (McDonald i sur. 2009).

Alternativna oksidaza je integralni membranski protein građen od dva monomera (slika 1). Masa pojedinog monomera je približno 32 kDa (Siedow i sur. 1995).

Prvi strukturni model (SUM model) predložili su 1995. godine James N. Siedow, Ann L. Umbach i Anthony L. Moore, a 1999. godine Martin E. Andersson i Pär Nordlund predložili su drugi, mnogo točniji i precizniji, model (AN model) na temelju poznatih sekvenci cDNA molekula koje kodiraju proteinske podjedinice alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2000).



**Slika 1.** Struktura alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2002)

Ekspresija alternativne oksidaze potaknuta je u različitim stresnim uvjetima kao što su smrzavanje, napad patogena, otpadanje listova, suša, osmotski stres te tijekom sazrijevanja

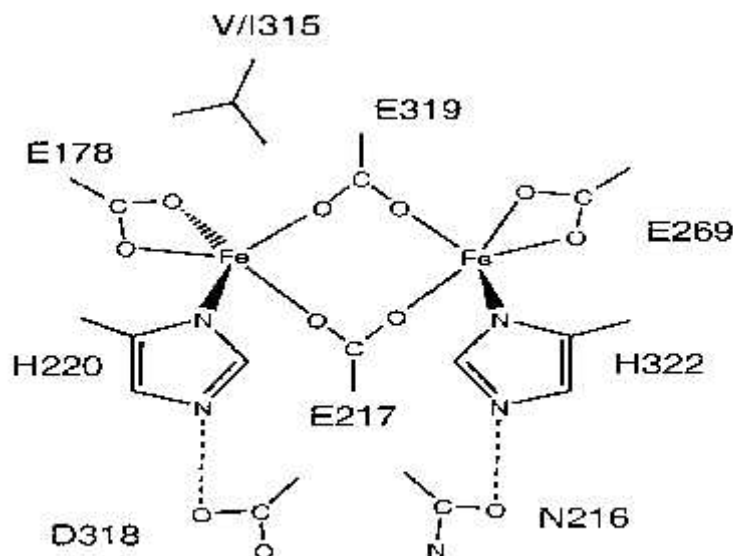
plodova. Aktivnost je regulirana u skladu s redoks stanjem mitohondrija i koncentracijom piruvata.

U normalnim uvjetima u stanici kisik je krajnji akceptor elektrona u lancu prijenosa elektrona i prima ih sa citokrom *c*-oksidaze. U stresnim uvjetima alternativna oksidaza, koja za razliku od citokrom *c*-oksidaze nije hem protein, predaje elektrone kisiku pri čemu se zaobilazi citokrom *c*-oksidaza i zato se taj put naziva „put neovisan o citokromu“ (slika 3). Prilikom takvog prijenosa elektrona velika količina energije se oslobađa u obliku topline koja se u nekih biljaka kao što su kozlac i lotos iskorištava kao poticaj za isparavanje mirisnih komponenti kojima se privlače kukci (Buchanan i sur. 2002). Alternativna oksidaza je kodirana u jezgri, a sintetizira se na ribosomima u citosolu. Sinteza je potaknuta inhibicijom lanca prijenosa elektrona. Za indukciju alternativne oksidaze u vrsti *Arabidopsis thaliana* u prisutnosti inhibitora Krebsovog ciklusa, kao što su antimicin A i monofluoroacetat, potrebna je aktivnost nekoliko gena. U vrste *Neurospora crassa* alternativna oksidaza kodirana je samo jednim *aod-1* genom, a kasnije su otkriveni još neki dodatni geni koji su uključeni u put prijenosa signala za njenu ekspresiju (Chae i sur. 2007).

## 2. STRUKTURA ALTERNATIVNE OKSIDAZE

Alternativna oksidaza ubraja se u 2Fe karboksilatnu skupinu proteina za koju je karakterističan ne-hemski 2Fe centar i u koju se ubrajaju i stearyl-ACP- desaturaza-1, metan monooksigenaza i R2 podjedinica ribonukleotid reduktaze. To je velik homodimerni integralni protein od 32 kDa koji je kodiran u jezgri malom obitelji jezgrinih gena *Aox1*, *Aox2a* i *Aox2b*, a mjesto djelovanja mu je unutarnja membrana mitohondrija (Albury i sur. 2010). Sastoji se od 2Fe centra i četiri uzvojnice koje se provlače kroz membranu, a međusobno su povezane -uzvojnicom. Dva atoma željeza vezana su na četiri uzvojnice pomoću glutaminskih i histidinskih ogranka, i imaju ključnu ulogu u samom procesu redukcije kisika (slika2). Proces odvajanja alternativne oksidaze u svrhu istraživanja je otežan zbog snažnih interakcija koje se ostvaruju između proteina i membrane, to nije između hidrofobne regije proteina koja je okružena s pozitivno nabijenim ograncima i fosfolipidnim glavama lipidnih molekula u membrani. Upravo stoga je većina istraživanja rađena na djelomično pročišćenom proteinu.

Na samom proteinu možemo razlikovati nekoliko domena: aktivno mjesto, vezno mjesto za ubikvinol koji je glavni reducirajući supstrat alternativne oksidaze i veznu domenu koja služi za vezanje na membranu. U aktivnom mjestu nalazi se 2Fe centar i javljaju se tri očuvana EXXH motiva. EXXH motivi, to nije glutaminski i histidinski ogranci koji su smješteni na drugoj i četvrtoj uzvojnici i međusobno su antiparalelni, ključni su za stvaranje 2Fe veznog centra. Oba terminalna kraja alternativne oksidaze, i N-terminalni i C-terminalni dio, nalaze se između dvije membranske regije. Pri tome 1/3 sekvence gradi N-, a 2/3 C-terminalni kraj (Umbach i sur. 2005). Jedan EXXH motiv smješten je u blizini N-terminalnog kraja i stoga se nalazi također između dviju membrana, a druga dva se nalaze u međumembranskom prostoru i sudjeluju u stvaranju 2Fe centra. Ukupno je u strukturu uključeno 335 aminokiselinskih ogranka koji grade četiri uzvojnice i veznu regiju između druge i treće uzvojnice. Vezna regija je segment koji je visoko hidrofoban te okružen s pozitivno nabijenim ograncima i prolazi kroz samu membranu. Pomoću njega se uzvojnice spajaju s C-terminalnim dijelom prve uzvojnice i tako nastaje hidrofobna regija koja može stvarati interakcije sa fosfolipidnim glavama i pomoću tih interakcija sam protein je vezan i stabiliziran na unutarnjoj mitohondrijskoj membrani.

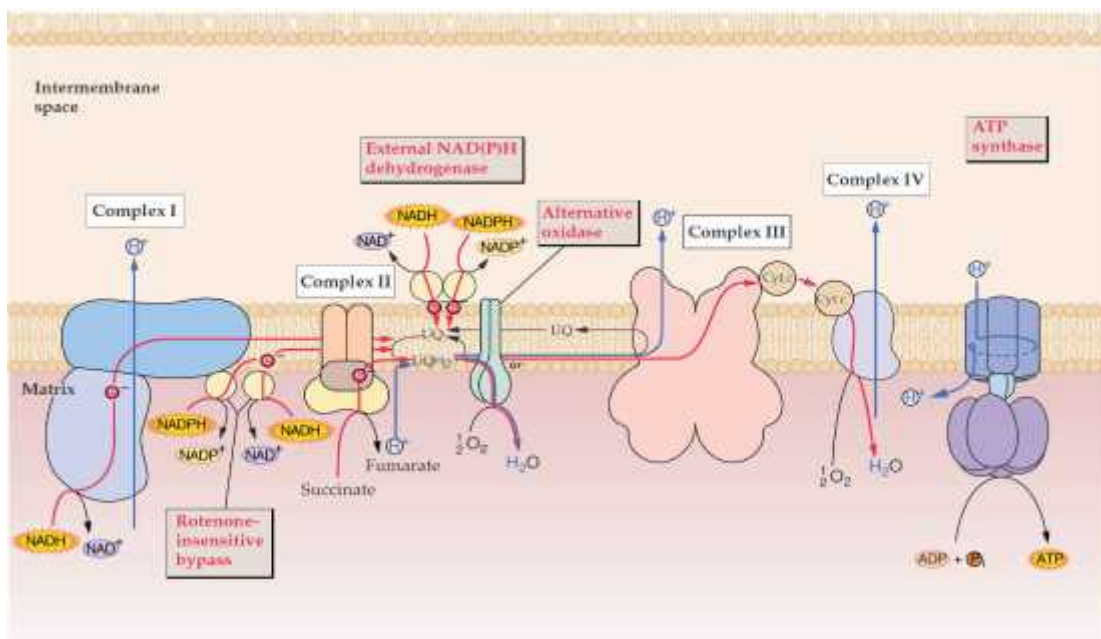


**Slika 2.** Fe centar alternativne oksidaze (Andresson i Nodlund 1999)

Vezno mjesto za ubikvitin je utor širok 0,5 nm i dug 1 nm, a sadrži ogranke L177, A181, P184, G185, V187, L210, A/S214, G265, L268 i V/I272. Svi ti ogranci su smješteni jedan ili dva okreta uzvojnice od veznih mjesta za željezo na prvoj, drugoj i trećoj uzvojnici (Tanton i sur. 1999). Prisutnost piruvata ili tiamin pirofosfata uzrokuje konformacijsku promjenu kojom se omogućava da ubikvitin pristupi svom veznom mjestu (Umbach i sur. 2005). Promjena konformacije podjedinica ograničena je veznom regijom kojom se protein spaja s membranom i dva cisteinska ogranka Cys<sub>I</sub> i Cys<sub>II</sub>. Cys<sub>I</sub> ogranak jednog monomera inaktivira alternativnu oksidazu stvaranjem disulfidne veze sa Cys<sub>I</sub> ogranakom drugog monomera. Ukoliko se na reducirani Cys<sub>I</sub> ogranak veže  $\alpha$ -keto kiselina, kao što je piruvat, dolazi do aktivacije alternativne oksidaze. Ukoliko se Cys<sub>I</sub> ogranak zamijeni nekom pozitivno nabijenom aminokiselinom, zbog onemogućenog nastanka disulfidnog mosta kojim bi se enzim inaktivirao, dobivamo konstitutivno aktivan enzim. Vezanjem manjih  $\alpha$ -keto kiselina i glioksilata na Cys<sub>II</sub> ogranak također je moguće regulirati aktivnost alternativne oksidaze (Buchanan i sur. 2000).

### 3. ULOGA ALTERNATIVNE OKSIDAZE

Respiratorni lanac biljnih mitohondrija vrlo je sličan respiratornom lancu sisavaca koji se sastoji od četiri proteinska kompleksa: kompleksa I ili NADH-dehidrogenaze, kompleksa II ili suksinat-dehidrogenaze, kompleksa III ili citokrom *bc<sub>1</sub>* kompleksa i kompleksa IV ili citokrom *c*-oksidaze te ATP-sintaze (Slika 3). Alternativna oksidaza je uz citokrom *c*-oksidazu mogu i terminalni akceptor elektrona u respiratornom lancu prijenosa elektrona u mitohondrijima. Na njeno djelovanje ne utječu inhibitori citokrom *c*-oksidaze i citokrom *bc<sub>1</sub>* kompleksa. Katalizira redukciju  $O_2$  u  $H_2O$  pri čemu je stopa prijenosa protona odvijanja prijenos preko unutarnje mitohondrijske membrane niža pa se u manjoj mjeri se uspostavlja gradijent protona. Naime, prelazak elektrona na kisik odvijanja se preko alternativne oksidaze, a tada u prijenosu ne sudjeluju kompleksi III i IV koji bi značajno doprinijeli stvaranju protonskog gradijenta (Berthold i sur. 2000).



**Slika 3.** Položaj alternativne oksidaze u dišnom lancu biljnih mitohondrija (Buchanan i sur. 2002)

esto se za alternativnu oksidazu kaže da joj aktivnost ovisi o stresnim uvjetima u kojima je uočeno znatno povećanje ekspresije. Stresni čimbenici koji potiču ekspresiju alternativne oksidaze su ranjavanje, smrzavanje, suša, osmotski stres, napad patogena,



tretman salicilnom kiselinom ili vodikovim peroksidom, ili nekom drugom tvari koja smanjuje ili inhibira aktivnost osnovnog respiratornog lanca (Juszczuk i Rychter 2003). Aktivnost alternativne oksidaze nešto je niža u nefotosintetskim biljkama, značajno varira od organizma do organizma, a pokazuje i tkivnu specifičnost (Moore i sur. 2002). U uvjetima smanjene ili ograničene dostupnosti adenilata ili ograničenog prijenosa elektrona omogućava normalno odvijanje ciklusa limunske kiseline. Istraživanja su pokazala da je u stresnim uvjetima povećana ekspresija *Aox1* gena, a da ekspresija *Aox2* gena ovisi o razvojnem stadiju i starosti same biljke i da se ekspresijom tih gena održava ravnoteža respiratornog metabolizma. Neprestano se u biljnim stanicama odvija niska ekspresija alternativne oksidaze što upućuje na njenu ulogu u održavanju integriranog biljnog metabolizma. Isti stresni uvjeti koji uzrokuju stvaranje reaktivnih oblika kisika uzrokuju povećanu ekspresiju alternativne oksidaze što upućuje na to da alternativna oksidaza umanjuje njihovo štetno djelovanje. Biljka djelovanjem alternativne oksidaze uspostavlja energetska ravnoteža sa okolišem i prilagođava se nastalim promjenama. Također omogućava prilagodbu biljke na uvjete smanjene količine fosfata. Ima i ulogu u sprječavanju programirane stanične smrti (Moore i sur. 2002). U transgenicnom duhanu koji je imao ograničenu ekspresiju alternativne oksidaze utvrđeno je da su dvije tvari koje uzrokuju programiranu staničnu smrt prisutne u mnogo većoj koncentraciji od uobičajene, a to su bile salicilna kiselina i vodikov peroksid. Kod S4 mutanta duhana utvrđeno je da prekomjerna ekspresija alternativne oksidaze značajno reducira veličinu štetnih lezija i da povećava otpornost na programiranu staničnu smrt uzrokovanu vodikovim peroksidom, kao i da u takvim mutantima imamo pet puta manju količinu reaktivnih oblika kisika. Pretpostavlja se da se razvila u davnoj prošlosti u mitohondrijima biljaka kao prilagodba na prelazak iz anoksične u atmosferu bogatu kisikom te da se je zatim primarnim endosimbiotskim događajem „preselila“ i u kloroplaste. Plastidna alternativna oksidaza je strukturom je jednaka onoj iz mitohondrija pri čemu mogu nastati reaktivni oblici kisika koji mogu narušiti strukturu i funkciju kloroplasta (Juszczuk i Rychter 2003).

U najnovijim istraživanjima se pokazalo da je osim u biljnim prisutna i u životinjskim mitohondrijima. Također je važna u uspostavljanju tolerancije na stres, osobito pri niskoj vrijednosti pH, povišenoj temperaturi i visokoj koncentraciji štetnih metala u okolišu (McDonald i sur 2009).

Tijekom godina istraživanja alternativne oksidaze uoeno je značajno nasljeđivanje njenih gena vertikalnom linijom, dok gotovo da i nije bilo uo enih primjera horizontalnog prijenosa. Na temelju toga je zaključeno da se alternativna oksidaza javlja u mnogo većem broju organizama nego što je do danas poznato, a da su u svega nekoliko skupina organizama njeni geni tijekom evolucijskog razvoja izgubljeni. Time je potvrđena pretpostavka o njenoj važnosti prilikom prelaska života iz vode na kopno (McDonald i sur 2009).

#### 4. LITERATURA

Albury, S. M., Elliott, C., Moore, L. A. (2010) Ubiquinol-binding site in the alternative oxidases: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition, Elsevier 46400, 14-21

Andersson, E. M., Nordlund, P. (1999) A revised model of the active site of alternative oxidases, FEBS Letters 449, 17-22

Austin, J. II, Scott, Z., Webber A. N. (2010) Plastid alternative oxidase functions as an alternative electron acceptor in *Arabidopsis* and may protect young plastids from photodamage, Lycris Universe AZ 85287 - 1601

Buchanan, B., Gruissem, W., Russel, J.(2002) Biochemistry and Molecular Biology of Plants, John Wiley & Sons, Inc , USA , str. 696 - 706

Berthold, A. D., Andersson, E. M., Nordlund, P. (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidases, Elsevier 1460, 241-254

Chae, S. M., Nargang, E. C.I, Cleary ,A. I., Lin C. C., Todd, T. A., Nargang, E. F. (2007) Two Zinc – Cluster Transcription Factors Control Induction of Alternative Oxidase in *Neurospora crassa* , Genetics 177, 1997-2006

Juszczuk, M. I., Rychter, M. A. (2003) Alternative oxidases in higher plants, Science 50, 1257-1271

McDonald, A. E., Vanlerberghe, C. G., Staples, F. J. (2009) Alternative oxidases in animals: unique characteristics and taxonomic distribution, Experimental Biology 212, 2627 - 2634

Moore, L. A., Albury, S. M., Crichton, G. P., Affourtit, C. (2002) Function of the alternative oxidases: is it still a scavenger? , Plant Science 7, 478 - 481

Siedow, N. J., Umbach, L. A., Moore, L. A. (1995) The active site of the cyanide – resistant oxidases from plant mitochondria contains a binuclear iron center, FEBS Letters 362, 10-14

Tanton, L. L., Nargang. E. C., Kessler E. K., Li, Q., Nargang, E. F. (2002) Alternative oxidases expression in *Neurospora crassa* , Academic press 39, 176-190

Umbach, L. A., Ng, S. V., Siedow, N. J. (2005) Regulation of plant alternative oxidases activity: A tale of two cysteines, 1757, 135-142

## 5. SAŽETAK

Alternativna oksidaza nalazi se u dišnom lancu mitohondrija biljaka, a također i u nekim plastidima kao što su kloroplasti. Nije prisutna samo u biljkama, kao što se prvotno mislilo, već je dokazana i u nekim životinjama. Ekspresija alternativne oksidaze usko je povezana s pojavom različitih stresnih uvjeta što dovodi do zaključka da doprinosi otpornosti na takve uvjete, ali i zaštiti biljnog tkiva od štetnih i inak reaktivnih oblika kisika. Pretpostavlja se da se tijekom evolucije razvila kao prilagodba na nove životne uvjete u kojima su se našli biljni, ali i životinjski organizmi prilikom prilagodbe na život na kopnu. Danas je poznat velik broj biljnih, ali i neki životinjski organizmi, u kojima je zastupljena pa se pretpostavlja se da će se daljnjim istraživanjima upotpuniti saznanja o njezinoj ulozi.

## **6. SUMMARY**

Alternative oxidase is a component of mitochondrial respiratory chain in plants, but it is also found in some plastids such as chloroplasts. It is not only present in plants, as it was originally meant. It is already found in some animals. Expression of alternative oxidase is closely associated with various stress conditions, which leads to the conclusion that it is important in survival in such conditions, but also in protecting plant tissues from the harmful effects of reactive oxygen species. It is supposed that it was developed during evolution as an adaptation of plant and animal organisms to life on land. Today it known that alternative oxidase is present in a great number of plant species and also in some animal oragnisms. It could be expected that the knowledge about its role will be completed in further investigations.

.